

ENDOMYSIUM-ANTIKÖRPER DER IgA-KLASSE

(IgA-EMA)

BEI DERMATITIS HERPETIFORMIS DUHRING

UND ZÖLIAKIE

NACHWEIS UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Peter Reff

Diss.
München
1906



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c.O.Braun-Falco

ENDOMYSIUM-ANTIKÖRPER DER IgA-KLASSE
(IgA-EmA)
BEI DERMATITIS HERPETIFORMIS DUHRING
UND ZÖLIAKIE
NACHWEIS UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Reff
aus Straubing
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.h.c.O.Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der
mündlichen Prüfung: 03.06.1986

Meinen Eltern

und

Dr. Flora und Dr. Imre Horvath



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	
1. Klinik der Dermatitis herpetiformis Dühring (DH)	1
2. Histologie der Dermatitis herpetiformis Dühring	3
3. Glutensensitive Enteropathie bei Dermatitis herpetiformis Dühring	4
4. Immunpathologie bei Dermatitis herpetiformis Dühring	6
4.1. Immunphänomene in der Haut	6
4.2. Immunphänomene im Serum	9
II. ZIELSETZUNG	13
III. PATIENTENGUT UND METHODEN	14
1. Patientengut	14
2. Methoden	15
2.1. Indirekte Immunfluoreszenz	15

	Seite
2.2. Indirekte Immunperoxidase-Methode	19
IV. ERGEBNISSE	25
1. Bindungsmuster von IgA-Endomysium-Antikörper (IgA-EmA)	25
2. Vorkommen von IgA-EmA bei Dermatitis herpetiformis Duhring, Zöliakie und lineärer IgA-Dermatose (LAD)	37
2.1. Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz	37
2.2. Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode	40
2.3. Nachweis nach gelchromatographischer Auftrennung der Serumimmunglobuline	42
3. IgA-EmA bei glutensensitiver Enteropathie	45
3.1. Gemeinsames Vorkommen von IgA-EmA und Gliadin-Antikörper bei DH, LAD und Zöliakie	46
3.2. IgA-EmA unter glutenfreier Diät bzw. unter Therapie mit DADPS	48
3.3. IgA-EmA nach Glutenbelastung	48
3.4. Nachweis von IgA-EmA nach Absorption mit Gliadin	51

V. DISKUSSION	52
1. Diskussion der Methode	52
2. Diskussion der Ergebnisse	54
3. Diskussion der immunpathologischen Bedeutung von IgA-EMA	57
VI. ZUSAMMENFASSUNG	59
VII. LITERATURVERZEICHNIS	62
VIII. DANKSAGUNG	75
IX. LEBENSLAUF	76

I. EINLEITUNG

1. Klinik der Dermatitis herpetiformis Duhring

Dermatitis herpetiformis Duhring (DH) ist eine chronische papulovesikuläre Dermatose.

Sie tritt in jedem Alter auf, jedoch mit gehäuftem Vorkommen im dritten und vierten Dezenium.

Männer erkranken häufiger als Frauen.

Zu Beginn steht Juckreiz im Vordergrund. Dann zeigen sich urtikarielle Erytheme, auf denen sich herpetiform gruppierte Blasen bilden können.

Typisch ist die Polymorphie der Hautveränderungen: man beobachtet sowohl die herpetiformen Blasen auf erythematösem Grund als auch ödematöse entzündliche Papulae, Papulovesikeln und Erosionen.

Infolge Austrocknung des Blaseninhaltes entstehen Krusten, die beim Verschwinden eine braunrötliche Hautverfärbung hinterlassen (s. Abb. 1).

Der starke Juckreiz der Hauterscheinungen veranlaßt den Patienten zu kratzen, wodurch es zur bakteriellen Superinfektion kommen kann, die das Krankheitsbild verändert und die Diagnose erschwert.

Prädilektionsstellen sind oberer Schultergürtel, Glutäalregion und Kapillitium, ferner Unterarmstreckseiten und Ellenbogen, sowie Unterschenkelstreckseiten und Knie. Die Effloreszenzen sind auffallend symmetrisch verteilt. Die Mundschleimhaut ist praktisch nie befallen (1,50).

Fry und Seah überprüften in einer Studie mit 42 DH-Patienten diese klinischen Kriterien (25).

Es zeigte sich, daß nur 15 (36%) der 42 Patienten mit DH bei ihrer ersten Untersuchung an einer dermatologischen Klinik die typischen Erscheinungen aufwiesen, die zur Diagnose führten.

Deshalb sind weitere Kriterien zur Diagnose dieser Erkrankung erforderlich.

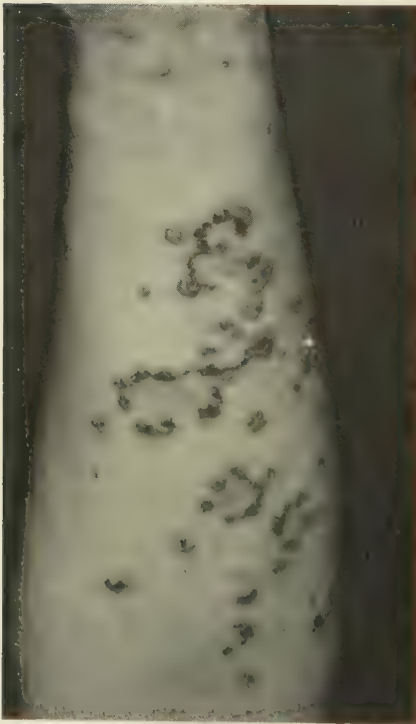


Abb.1: Typische herpetiforme Anordnung der Blasen

2. Histologie bei DH

Besonders ausgeprägt finden sich die histologischen Veränderungen in der erythematösen Umgebung initialer Blasen (43). In den dermalen Papillenspitzen sieht man Mikroabszesse mit Ansammlungen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Kerntrümmer (40).

Diese intrapapillären Mikroabszesse sind typisch für DH (s. Abb. 2).

Es zeigt sich eine subepidermale Spannungsblase ohne Akantholyse. Im Blaseninhalt sind sehr viele eosinophile und neutrophile Granulozyten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Blasenbildung im Stratum papillare beginnt, wo es zu Ödem, nekrobiotischen Veränderungen an den Kollagenfasern und einer zellulär-entzündlichen Reaktion kommt.

Es folgt eine Kontinuitätstrennung zwischen Epidermiszellen und darunterliegendem Korium (8).



Abb. 2:

Mikroabszess in der Papillenspitze und beginnende subepidermale Spaltbildung
(Hämatoxylin-Eosin)



Weiterhin von diagnostischer Bedeutung ist der therapeutische Erfolg mit Sulfonen (Diamino-Diphenyl-Sulfon = DADPS Bayer).

DADPS wurde beim M. Duhring erstmals 1953 von Kruizinga und Hamminga eingesetzt (41).

Der Wirkungsmechanismus dieser Therapie ist ungeklärt (8). Es wird angenommen, daß der therapeutische Effekt durch eine unspezifische Wirkung auf die Neutrophilen - Funktion beruht (74).

Es handelt sich um eine morbestatische Therapie, die jahrelang durchgeführt werden muß.

Die Diagnose DH kann also auch ex juvantibus gestellt werden.

3. Glutensensitive Enteropathie bei DH

Von Marks, Shuster und Watson wurde 1966 erstmals die Assoziation des M. Duhring mit einer glutensensitiven Enteropathie in zwei Drittel aller Fälle beschrieben (54).

An histologischen Veränderungen treten Zottenatrophie und lymphozytäre Infiltrationen auf (11,20,37,71,80).

Ähnliche pathologische Mukosaverhältnisse kennzeichnen die idiopathische Steatorrhoe und Zöliakie.

Klinische Anzeichen einer Malabsorption bei DH sind jedoch nur in sehr wenigen Fällen beschrieben worden (42).

Man betrachtet die Dünndarmveränderungen als gluten-induziert (24,55):

ausgelöst wird die Enteropathie durch das Oligopeptid Gliadin, ein Spaltprodukt des Weizenproteins Gluten, mit einem Molekulargewicht zwischen 800 und 900, das aus 6 - 7 Aminosäuren besteht (52).

Die Pathogenese der glutensensitiven Enteropathie ist bisher ungeklärt.

Es werden hauptsächlich zwei Mechanismen diskutiert: einmal eine direkte Zytotoxizität des Gliadins auf die Mukosazellen, zum anderen ein immunologischer Mechanismus mit der Bildung von Anti-Gliadin-Antikörper (76). Die Enteropathie kann durch glutenfreie Diät gebessert werden (63).

Der Einfluß der glutenfreien Diät auf die Hauterscheinungen wird unterschiedlich beurteilt:

von einigen Autoren wird ein Effekt der Diät bestritten (71), andererseits wurden aber auch Vollremissionen alleine durch Diät ohne zusätzliche medikamentöse Therapie beschrieben (64);

die meisten Autoren stimmen darin überein, daß unter glutenfreier Diät zumindest eine Reduktion der täglichen DADPS - Dosis möglich ist, um den Patienten erscheinungsfrei zu halten (22,28,29).

Auch konnte gezeigt werden, daß eine erneute Belastung mit Gluten zum Wiederauftreten der Hauterscheinungen führt (6,21,24).

4. Immunpathologie bei DH

4.1. Immunphänomene in der Haut

Seit der Entdeckung von Immunfluoreszenzphänomenen bei DH durch Cormane (15) und van der Meer (78) gilt der Nachweis von Immunglobulin A in befallener oder gesunder Haut durch die direkte Immunfluoreszenz (DIF) als der zuverlässigste Parameter für die Diagnose M. Dühring (13,31, 33,37,67,78).

Mittels DIF können in den Papillenspitzen fixierte granuläre Immunglobulinablagerungen der IgA-Klasse zusammen mit Komplementkomponenten nachgewiesen werden (s.Abb.3).

Chorzelski et al. wiesen 1971 erstmals darauf hin, daß bei DH zwei unterschiedliche Ablagerungsmuster von IgA vorkommen können (13):

- a) granuläre und fibrilläre Niederschläge vorwiegend in den Papillenspitzen (s.Abb.3),
- b) lineäre Niederschläge, die - wie die IgG-Ablagerungen bei bullösem Pemphigoid - kontinuierlich dem Verlauf der Basalmembranzzone folgen (s.Abb.4).

In den folgenden Jahren bestätigten verschiedene Autoren das Vorkommen von lineären IgA-Ablagerungen bei etwa 10 - 25 % der Patienten mit DH (25,47,49,59,62,68,70,81).

Immunoelektronenmikroskopisch können zwei Formen der lineären IgA - Dermatoze (LAD) unterschieden werden (58):

bei dem dermalen Typ werden IgA-Ablagerungen unter und bei dem Lamina-lucida-Typ oberhalb der Basallamina nachgewiesen.

Das klinische und histologische Bild entspricht in vielen Fällen dem der DH.

Allerdings hat die Unterscheidung zwischen LAD und DH mit papillären IgA-Ablagerungen therapeutische und klinische Bedeutung, da die LAD sehr selten mit einer glutensensitiven Enteropathie verbunden ist (58).

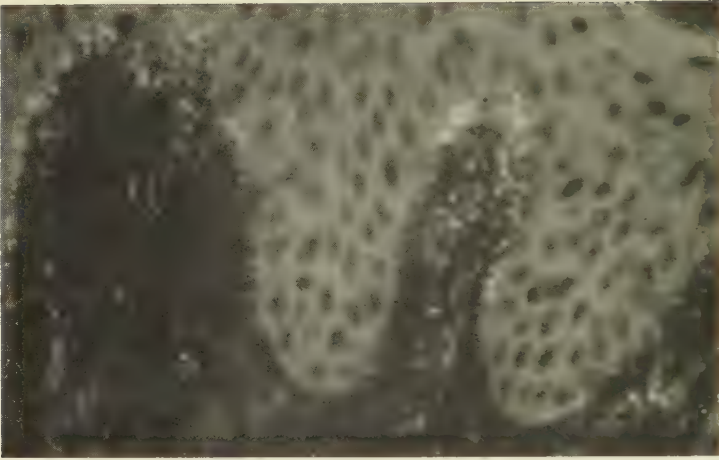


Abb.3: Granuläre IgA - Ablagerungen in den Papillenspitzen (DIF, FITC-anti-Human-IgA)



Abb.4: Lineäre IgA - Ablagerungen entlang der Basalmembranzzone (DIF, FITC-anti-Human-IgA)

4.2. Immunphänomene im Serum

Im Gegensatz zu den Befunden der DIF haben humorale Immunphänomene bei der Diagnostik der DH bisher keine große Bedeutung.

Es wurden Autoantikörper gegen Thyroid und Magenmukosa beschrieben (17,19,61); diese Antikörper scheinen aber weder pathogenetisch noch diagnostisch bedeutend zu sein.

Wie bereits erwähnt, haben ein großer Teil der Patienten mit DH eine glutensensitive Enteropathie.

Bei Patienten mit Zöliakie wurden erstmals 1958 von Berger zirkulierende Gliadin-Antikörper beschrieben (4).

Dies wurde seitdem von vielen Autoren bestätigt (11,16,18, 30,38,75).

In letzter Zeit wurden mit einer neuen Methode bei 100 % der Zöliakie-Patienten Gliadin-Antikörper der IgA- und IgG-Klasse beschrieben (9,10,72).

Die Diagnose Zöliakie kann aber letztlich nur durch eine Darmbiopsie vor und nach einer glutenfreien Diät gestellt werden (56).

Auch bei 60 - 70 % der Patienten mit DH konnten zirkulierende Gliadin-Antikörper nachgewiesen werden (44,57), die hauptsächlich der IgG-Klasse, selten auch der IgA-Klasse angehören (77).

Der Antikörper-Titer ist dabei abhängig von der Ernährung: unter glutenfreier Diät kommt es zu einem signifikanten Abfall der Gliadin-Antikörper-Titer (39).

Dies wurde gleichfalls bei Patienten mit Zöliakie beobachtet (72).

1971 wurden zum ersten Mal von Seah et al zirkulierende Antikörper gegen Retikulinfasern im Serum von Patienten mit DH, idiopathischer Steatorrhoe und Zöliakie nachgewiesen (68).

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) zeigte sich ein Fluoreszenzmuster von feinen Fasern um die Sinusoide der Leber. Eine Vorbehandlung der Kryostatschnitte mit Kollagenase führte nicht zum Verschwinden der Fluoreszenz. Es konnte sich also bei den Bindungsstellen der Antikörper nicht um Kollagenfasern handeln.

Nach dem histologischen Bild wurden diese zirkulierenden Antikörper Retikulin-Antikörper genannt.

Mehrere Autorengruppen haben seitdem Retikulin-Antikörper bei DH, idiopathischer Steatorrhoe, Zöliakie und M. Crohn nachgewiesen (2,18,27,46,51,53,69), allerdings sind die Angaben über die Häufigkeit der Retikulin-Antikörper bei DH und den anderen gastrointestinalen Erkrankungen sehr unterschiedlich.

Die Untersuchung von Seah und Fry 1971 (68) ergab, daß nur 17 % der DH-Patienten Retikulin-Antikörper aufwiesen, während Hallström und Reunala 1985 (27) diese Antikörper bei 68 % der DH-Patienten nachweisen konnten.

Nachweismethode war stets die IIF.

Übereinstimmend berichteten die verschiedenen Forschungsgruppen über den Abfall des Retikulin-Antikörper-Titers unter glutenfreier Diät (18,27,46,53,69).

Die nachgewiesenen Retikulin-Antikörper gehörten der IgG- und IgA-Klasse an.

In Tabelle 1 sind die bisherigen Ergebnisse über Retikulinantikörper bei DH, Zöliakie und M. Crohn zusammengefaßt.

Von Chorzelski et al. wurden 1983 erstmals Antikörper der IgA-Klasse beschrieben, die mit dem Endomysium der glatten Muskulatur des Ösophagus reagieren (12,14).

Diese IgA-Endomysium-Antikörper (IgA-EmA) konnten bei 68,4 % der Patienten mit DH und bei 60 % der Patienten mit Zöliakie nachgewiesen werden.

Demgegenüber zeigte kein Patient mit LAD dies IgA-EmA.

Nachweismethode war die IIF, als Antigensubstrat diente Affen-Ösophagus.

Seit der Erstbeschreibung dieser IgA-EmA bei DH stellt sich die Frage, ob sie eine Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung haben und ob sie für die Diagnostik der DH ebenso aussagekräftig wie die DIF sind.

Tabelle 1: Retikulin-Antikörper bei DH, Zöliakie und M.Crohn

	DH		CCD		M. Crohn		Kontrollen	
	ges.	ARA pos.	ges.	ARA pos.	ges.	ARA pos.	ges.	ARA pos.
Seah, Fry 1971 (68)	29	5 (17 %)	19	14 (74 %)			28	0 (0 %)
Alp, Wright 1971 (2)			71	38 (54 %)	59	15 (25 %)	43	0 (0 %)
Seah, Fry 1973 (69)	30 ^x 20 ^{xx}	9 (30 %) 2 (10 %)	26 ^x 20 ^{xx}	22 (85 %) 5 (25 %)	38	9 (24 %)	434 25	6 (1,4 %) 0 (0 %)
Magalhaes, Peters 1974 (53)					20	5 (25 %)		
Lancaster - Smith 1975 (46)	32 ^x 6 ^{xx}	6 (19 %) 1 (16 %)					30	0 (0 %)
Etermann, Felt- kamp 1977 (18)	34	4 (12 %)	6 ^x	2 (33 %)	50	3 (6 %)	95	2 (2 %)
Ljunghall, Schey- nius 1978 (51)	43	15 (34,9 %)					43	3 (7 %)
Hällström	50 ^{xxx}	34 (68 %)						

DH = Dermatitis herpetiformis Duhring

CCD = Zöliakie

^x = normale Diät

^{xx} = gluten-freie Diät

^{xxx} = alle Patienten wurden nach zweijähriger gluten-freier Diät seronegativ

ARA = Retikulin-Antikörper

II. ZIELSETZUNG

Thema der vorliegenden Arbeit sind humorale Immunphänomene bei Dermatitis herpetiformis Duhring.

Es sollen vier Punkte herausgestellt werden:

1. Nachweis von IgA-Endomysium-Antikörper (IgA-EmA) bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring, lineärer IgA-Dermatose und Zöliakie mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und der indirekten Immunperoxidase-Methode.
2. Untersuchung der diagnostischen Bedeutung von IgA-Endomysium-Antikörper bei Dermatitis herpetiformis Duhring und lineärer IgA-Dermatose.
3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den gleichzeitig im Rahmen einer internationalen kollaborativen Studie erhobenen Befunde.
4. Diskussion der möglichen Rolle von IgA-Endomysium-Antikörper in der Ätiologie und Pathogenese der Dermatitis herpetiformis Duhring.

III. Patientengut und Methoden

1. Patientengut

Untersucht wurden die Seren von neun Patienten mit DH. Durchschnittsalter der Patienten ist 40,8 Jahre (6-71), es handelt sich um fünf Männer und vier Frauen. In allen Fällen zeigte die DIF granuläre IgA-Ablagerungen in den Papillenspitzen (s.Abb.3).

Bei allen Patienten wurde eine Dünndarmbiopsie durchgeführt, sieben Biopsiebefunde ergaben Zottenatrophie unterschiedlicher Ausprägung im Jejunum, zwei normale Mukosaverhältnisse.

Weiterhin wurden die Seren von sieben Patienten mit LAD untersucht, fünf Männer und zwei Frauen. Das Durchschnittsalter dieser Patienten beträgt 40,4 Jahre (18-76).

Auch hier wurde die Diagnose anhand der DIF gestellt.

Bei allen sieben Patienten war eine lineare IgA-Ablagerung entlang der Basalmembranzzone zu sehen (s.Abb.4).

Bei zwei Patienten mit LAD, die anamnesticke Hinweise auf eine glutensensitive Enteropathie boten, wurden Dünndarmbiopsien durchgeführt. Beide Biopsien ergaben normale Mukosaverhältnisse.

Von Frau Dr. Bürgin-Wolff vom Kinderspital Basel wurden uns Seren von zehn Patienten mit Zöliakie zur Verfügung gestellt. Durchschnittsalter der Patienten beträgt 6,5 Jahre (2-23), sechs Buben und vier Mädchen.

Zusätzlich wurden 20 Kontrollseren (vier Patienten mit Pemphigus vulgaris, sechs Patienten mit bullösem Pamphigoid, ein Patient mit Psoriasis vulgaris, ein Patient mit Urtikaria, sowie sieben gesunde Personen) getestet.

Durchschnittsalter dieser Gruppe beträgt 50,2 Jahre (18-68), es handelt sich um acht Männer und sieben Frauen.

2. Methoden

2.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Prinzip

Für die technische Durchführung der IIF werden von geeigneten tierischen Gewebesubstraten Kryostatschnitte angefertigt und in einem ersten Inkubationsschritt mit Patientenserum überschichtet.

Dabei binden krankheitstypische Antikörper im Patientenserum an die entsprechenden Antigenstrukturen des tierischen Gewebesubstrates.

Zum Nachweis dieser Antigen-Antikörper-Reaktion wird in einem zweiten Inkubationsschritt fluoreszenzmarkiertes Antiserum, das gegen menschliche Immunglobuline gerichtet ist, auf den Schnitt aufgebracht.

Die Gewebebezirke, an denen sich humane Immunglobuline aus dem Patientenserum an tierische Gewebestrukturen fixiert haben, werden somit durch die Indikatorreaktion mit dem fluoreszenzmarkierten Antihumanglobulin sichtbar gemacht (66).

Monospezifische Antiseren, d.h. Antiseren, die ausschließlich gegen bestimmte humane Serumproteine gerichtet sind, werden durch die Immunisierung von Versuchstieren hergestellt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert.

Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mit Licht aus dem blauvioletten Spektralbereich emittieren die FITC-markierten Antikörper grünes Licht, das mikroskopisch den Nachweis und die Lokalisation von Immunglobulinen aus dem Patientenserum zuläßt (65).

Material

Antigensubstrate

- 4 μ Kryostatschnitte von unfixiertem, nach Entnahme sofort bei -70°C gelagertem Affenösophagus und Kaninchenösophagus

Reagentien

- FITC-konjugiertes anti-Human-IgG (Kaninchen),
Fluoreszein/Protein (F/P)-Verhältnis = 3,0; AK-Konz. 24,7 mg/ml
(Atlantic Antibodies, Nonsuch Road, ME, USA)
- FITC-konjugiertes anti-Human-IgA (Kaninchen),
(F/P)-Verhältnis = 2,5; AK-Konz. 13,2 mg/ml
(Atlantic Antibodies)
- FITC-konjugiertes anti-Human-IgM (Kaninchen),
(F/P)-Verhältnis = 3,0; AK-Konz. 10,6 mg/ml
(Atlantic Antibodies)
- PBS-Puffer, pH 7,2; 0,01 M: 1,48 g Na₂HPO₄
0,43 g KH₂PO₄
7,20 g NaCl
ad 1000 ml Aqua dest.
- Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (24 x 32 mm).
- Eindeckmedium (Polyvinylalkohol-Glycerin-Gemisch).

Durchführung

IgA - Ema - Screening

- Inkubation von Patienten- oder Kontrollserum (Verdünnung 1:5 in PBS pH 7,2) mit den Antigensubstraten auf Objektträgern in feuchter Kammer für 30 min. bei 22°C.
- Entfernen der nicht gebundenen Serumbestandteile durch dreimaliges Spülen des Objektträgers in PBS pH 7,2 für jeweils 10 min.
- Inkubation der getrockneten Objektträger mit FITC-konjugiertem Antiserum gegen humanes IgG (F/P-Verhältnis 3,0; AK-Konz. 24,7 mg/ml; Verdünnung 1:120 in PBS), mit FITC-konjugiertem Antiserum gegen IgA (F/P-Verhältnis 2,5; AK-Konz. 13,2 mg/ml; Verdünnung 1:30 in PBS) und mit FITC-konjugiertem Antiserum gegen IgM (F/P-Verhältnis 3,0; AK-Konz. 10,6; Verdünnung 1:60 in PBS) in feuchter Kammer für 30 min. bei 22°C.
- Entfernen der nichtgebundenen FITC-Konjugate durch dreimaliges Spülen in PBS pH 7,2 für jeweils 10 min.
- Eindecken der Präparate in Polyvinylalkohol-Glycerin-Einschlußmedium.
Lagerung der Präparate bei 4°C.
- Ablesen innerhalb von 12 h unter dem Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Firma Leitz, Wetzlar) mit Auflichtilluminator nach Ploem. Filterkombination: Erregerfilter 2 x KP 490 (= KP 500), Sperrfilter K 510, Filter im Lampenhaus 4 mm BG 38.

Die Spezifität der IgA - EMA - Immunfluoreszenz wurde durch folgende Kontrollen gesichert:

- Leerschnitte (ohne Vorbehandlung mit Konjugaten oder Serum) zur Beurteilung der Autofluoreszenz des Gewebes.
- Pufferkontrolle (Vorbehandlung mit FITC-Konjugaten ohne Serum) zur Beurteilung der nicht-immunologisch bedingten unspezifischen Anfärbung des Antigensubstrates.
- Negatives Kontrollserum.
- Positives Kontrollserum mit IgA-EMA-Titer über 1:80.

Titerbestimmung:

Bei positivem Ausfall des Screening - Tests auf Affen- oder Kaninchenösophagus erfolgte die Bestimmung der Antikörpertiter in weiteren Reihenverdünnungen des positiven Serums (1:5 - 1:320 in PBS pH 7,2).

Der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, die noch eine deutlich ablesbare Fluoreszenz zeigte, wurde als Titer angegeben.

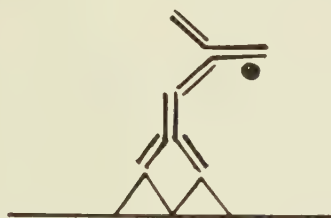
2.2. Indirekte Immunperoxidase-Methode

Die indirekte Immunperoxidase-Methode folgt dem gleichen Prinzip wie die indirekte Immunfluoreszenz:

Zirkulierende Antikörper im Patientenserum binden sich an die Antigene des Gewebesubstrates. Um diese gebundenen Antikörper lokalisieren zu können, werden Peroxidase-konjugierte Antikörper benötigt, die sich an die ersten Antikörper binden.

Die zweiten, konjugierten, Antikörper sind spezifisch gegen menschliche Immunglobuline gerichtet (7) (s.Abb.5).

Abb.5:



Peroxidase-konjugierte
anti-Human-Antikörper

Antikörper im Patientenserum

Gewebsantigene

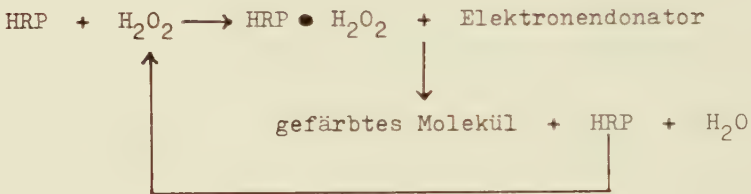
Das Enzym, das an die Antikörper gekoppelt ist, katalysiert eine spezielle Reaktion, wobei ein Substrat in einen Farbstoff oder in einen elektronendichten Teil umgewandelt wird.

Bei dieser immunzytochemischen Methode bildet das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP), Molekulargewicht 40 000, einen Komplex mit dem Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Der Komplex reagiert mit einem Elektronendonator zu dem Endprodukt - ein gefärbtes Molekül und Wasser.

Die Peroxidase wird dabei nicht verbraucht und kann so wiederum mit Wasserstoffperoxid reagieren und weitere gefärbte Moleküle bilden (s. Abb. 6).

Abb. 6:



Es gibt verschiedene Substanzen, die bei dieser Reaktion als Elektronendonatoren und Farbstoffe dienen.

Für den Einsatz der Immunperoxidase-Technik am Gewebe muß das gefärbte Endprodukt an der Stelle gebunden werden, wo es gebildet wurde.

Substanzen, die ein lösliches Endprodukt bilden, können nicht für diese Methode verwendet werden.

Die gebräuchlichsten Elektronendonatoren für die Immunperoxidase-Methode sind folgende (7):

- 3,3 Diaminobenzidin - Tetrahydrochloride (DAB)
- 2 - Amino - 9 - Ethylcarbazol (AEC)
- 4 - Chloro - 1 - Naphthol

Material

Antigensubstrate

- 4µ Kryostatschnitte von unfixiertem, nach Entnahme sofort bei -70°C gelagertem Affenösophagus und Kaninchenösophagus.

Reagentien

- Peroxidase (HRP) -konjugiertes anti-Human-IgG (Kaninchen)
(DAKOPATTS, 22, Guldbergvej, Postbox 1404, 2000 Kopenhagen, Dänemark)
- Peroxidase-konjugiertes anti-Human-IgA (Kaninchen)
(DAKOPATTS)
- PBS-Puffer, pH 7,2; 0,01 M: 1,48 g Na_2HPO_4
0,43 g KH_2PO_4
7,20 g NaCl
ad 1000 ml Aqua dest.
- Carbazollösung: 20 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol
auflösen in 12 ml Dimethylsulfoxid
+ 100 ml Michaelispuffer (pH 7,4)
+ 10 l konzentriertes H_2O_2
ad 200 ml Aqua dest.
- Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (24 x 32 mm)
- Eindeckmedium (Kaisers Glyzerigelatine)

Durchführung

IgA - Ema - Screening

- Inkubation von Patienten- oder Kontrollserum (Verdünnung 1:5 in PBS pH 7,2) mit den Antigensubstraten auf Objektträgern in feuchter Kammer für 30 min. bei 22°C.
- Entfernung der nicht gebundenen Serumbestandteile durch dreimaliges Spülen des Objektträgers in PBS pH 7,2 für jeweils 10 min.
- Inkubation der getrockneten Objektträger mit Peroxidase-konjugiertem Antiserum gegen humanes IgG (Verdünnung 1:120) und mit Peroxidase-konjugiertem Antiserum gegen humanes IgA (Verdünnung 1:30) in feuchter Kammer für 30 min. bei 22°C.
- Entfernung der nicht gebundenen Antiserumbestandteile durch dreimaliges Spülen des Objektträgers in PBS pH 7,2 für jeweils 10 min.
- Mikroskopisch kontrollierte Inkubation der Objektträger mit Carbazollösung (10-20 min).
- Spülen in Leitungswasser
- Evtl. Gegenfärbung mit Hämalaun
- Spülen in Aqua dest.
- Eindecken in Kaisers Glyceringelatine
- Ablesen unter dem Lichtmikroskop

Kontrollen

- Reaktionsablauf ohne Inkubation mit Primärantikörper (Patientenserum), unter Beibehaltung aller übrigen Schritte - zeigt unspezifische Bindungen des Antikörpers an Gewebsantigene.
- Enzymreaktion mit Carbazol ohne vorhergehende Inkubation mit anti-Human-Antikörper - zeigt endogene Peroxidaseaktivität.
- Negatives Kontrollserum.
- Positives Kontrollserum mit IgA-EmA-Titer über 1:80.

Titerbestimmung

Bei positivem Ausfall des Screening - Tests auf Affen- oder Kaninchenösophagus erfolgte die Bestimmung der Antikörpertiter in weiteren Reihenverdünnungen des positiven Serums (1:5 - 1:320 in PBS pH 7,2).

Der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, die noch eine deutlich ablesbare Färbung zeigte, wurde als Titer angegeben.

Bei einem Serum wurde nach dem IgA-EMA-Nachweis mit der indirekten Immunfluoreszenz und der indirekten Immunperoxidase-Methode eine gelchromatographische Auftrennung der Serumimmunglobuline durchgeführt:

dazu wurden HPLC (= high performance liquid chromatography) - Gelsäulen verwendet
(TSK - G 3000 SW kombiniert mit TSK - G 4000 SW,
je 0,75 x 30 cm, Probenvolumen 0,3 ml, Elutionsgeschwindigkeit 24 ml/h).

Elutionspuffer war Trismaleat mit 0,2 M Na_2SO_4 (pH 6,8).

Die Extinktion des Eluats wurde in einem Durchlaufphotometer bei 280 nm Wellenlänge gemessen.

Ein angeschlossener Schreiber zeichnete das Elutionsprofil auf.

Nach der chromatographischen Trennung wurden die Eluate auf ihren Gehalt an Immunglobulin G und A mit einem kinetischen Nephelometer (Beckmann Immunochemistry Analyser) geprüft (73).

IV. ERGEBNISSE

1. Bindungsmuster der IgA-Endomysium-Antikörper

Der Ösophagus von Affe und Kaninchen ist in folgende Schichten gegliedert (s.Abb.8):

Zunächst liegt die aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel und einer bindegewebigen Lamina propria bestehenden Schleimhaut, an deren Grenze zur Submukosa eine unterschiedlich kräftige Lage von glatten Muskelzellen, die Lamina muscularis mucosae zu finden ist.

Auf die Submukosa folgt die Tunica muscularis, die aus einer inneren, zirkulär verlaufenden und einer äußeren Schicht längs orientierter Muskelzellen besteht.

Nur im oberen Teil des Ösophagus besteht die Tunica muscularis aus quergestreifter Muskulatur, kaudal wird sie von glatter Muskulatur abgelöst.

Bei der quergestreiften, nicht jedoch bei der glatten Muskulatur, dringt gefäß- und nervenführendes Bindegewebe, das Perimysium externum, ins Innere des Muskels ein und umfaßt mehrere Gruppen von Primärbündeln.

Ins Innere der Primärbündel gelangt schließlich ein vorwiegend aus Retikulinfasern bestehendes sehr zartes Bindegewebe, das Endomysium, das jede einzelne Muskelfaser und das Sarkolemm umgibt.

Ebenso wie die Muskelfasern der quergestreiften Muskulatur werden die Muskelzellen der glatten Muskulatur von einem feinen retikulären Fasergitter umgeben (3).

Die Retikulinfasern als Hauptbestandteil des Endomysiums sind argyrophile Fasern, d.h. sie lassen sich durch Versilberung, z.B. nach der Methode von Bielschowsky, anfärben (R. Benno, Mikrosk. Technik, §1925)(s.Abb.22).

Früher wurde das versilberbare Kollagen als unreifes Kollagen oder Präkollagen angesehen. Heute wird das sog. Retikulin als eine morphologische Form von Kollagentyp III angesehen;

Kollagentyp III ist durch einen hohen Gehalt an 4-Hydroxyprolin charakterisiert und kommt vor allem im Interstitium parenchymatöser Organe, in der Lamina propria von Schleimhäuten, in der Dermis und im Uterus vor (3).

Abb. 8 zeigt, daß die IgA-EMA vorwiegend im Bereich der Lamina muscularis mucosae binden.

Der Antikörpernachweis erfolgte in diesem Präparat mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode. Zusätzlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun.

Abb. 9 zeigt dagegen eine Negativkontrolle.

Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, daß die Antikörper nicht mit den Muskelzellen direkt, sondern mit dem retikulärem Faserwerk (Endomysium) reagieren, das die Muskelfasern umgibt (s.Abb.10,11).

Abb 13 zeigt im Gegensatz dazu die Bindung von Antikörper an glatte Muskulatur.

Dabei sind die sog. ASMA (anti-smooth-muscle-antibodies) gegen innere Bestandteile der Muskelzelle, wahrscheinlich Actin gerichtet (26,60).

In der Negativkontrolle zur Abb.10 und 11 (Abb.12) erscheint das Endomysium als kontrastarmer Spalt.

Ein identisches Bindungsmuster zeigen diese Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz, wie in Abb.14 dargestellt ist.

Abb.15 zeigt die entsprechende Negativkontrolle in der IIF.

Abb.17 bis 19 zeigen in unterschiedlicher Vergrößerung, daß die Antikörper nicht nur mit der Lamina muscularis mucosae, sondern auch mit der Tunica muscularis reagieren. Der Vergleich zwischen den Abb. 20, 21 und 22 macht deutlich, daß IgA-EmA an Strukturen binden, die morphologisch mit den versilberbaren Retikulinfasern im Endomysium übereinstimmen.

Zu beachten ist, daß auf unseren Kaninchenösophagus-Kryostatschnitten im Bereich der Tunica muscularis eine zusätzliche innere, längsverlaufende Muskelschicht zu sehen ist, die im menschlichen Ösophagus auch vorhanden, allerdings nicht so stark ausgeprägt ist.

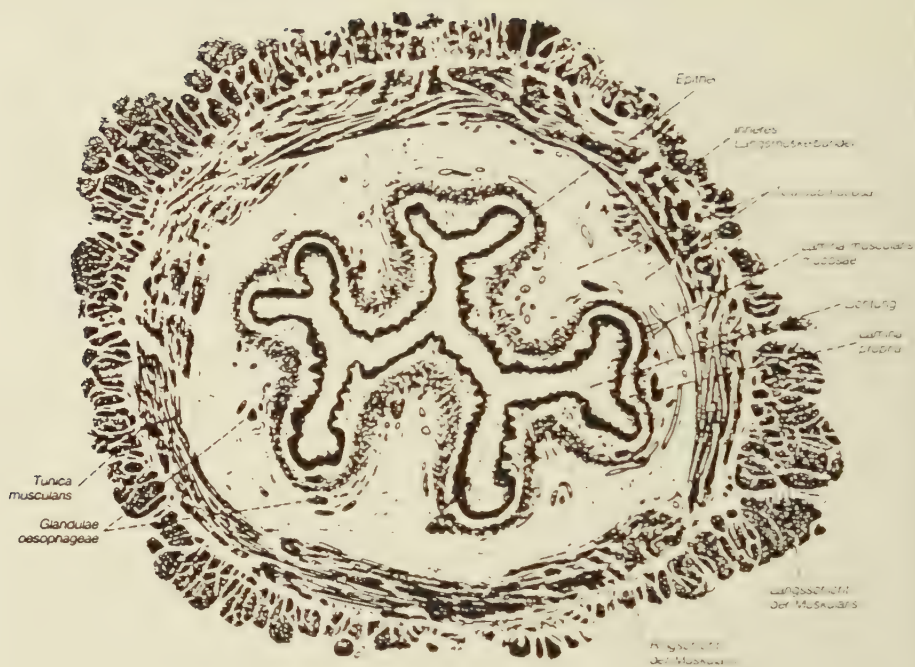


Abb. 7: Schematischer Querschnitt des Ösophagus
aus: Sobotta/Hammersen

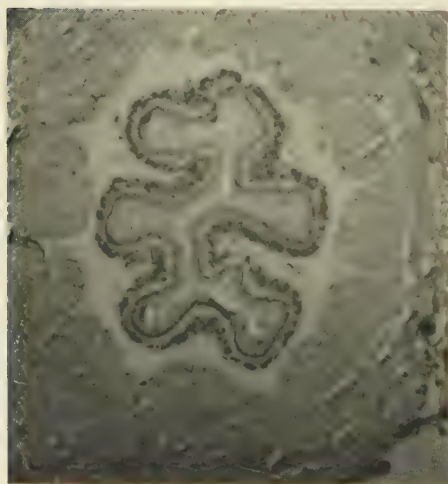


Abb. 8

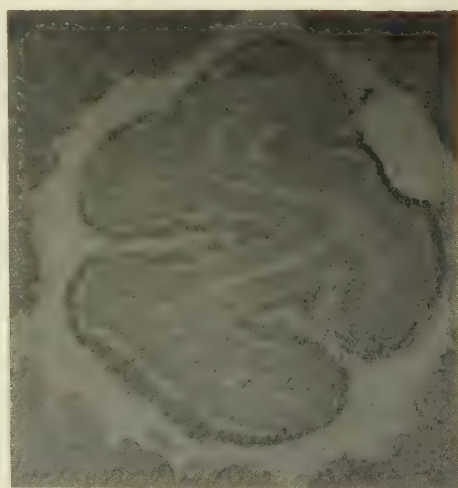


Abb. 9



Abb. 10

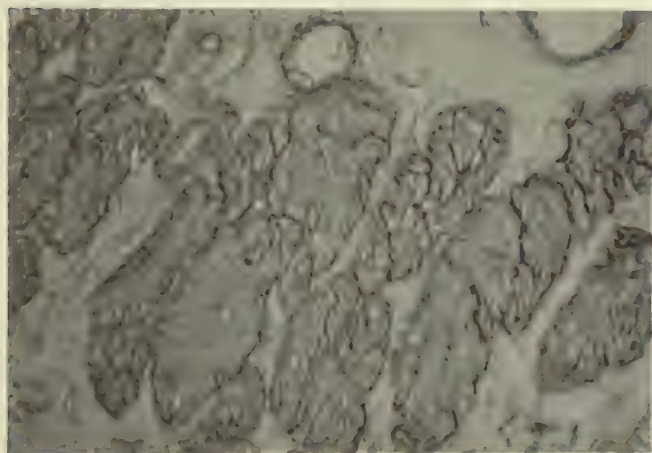


Abb. 11



Abb. 12

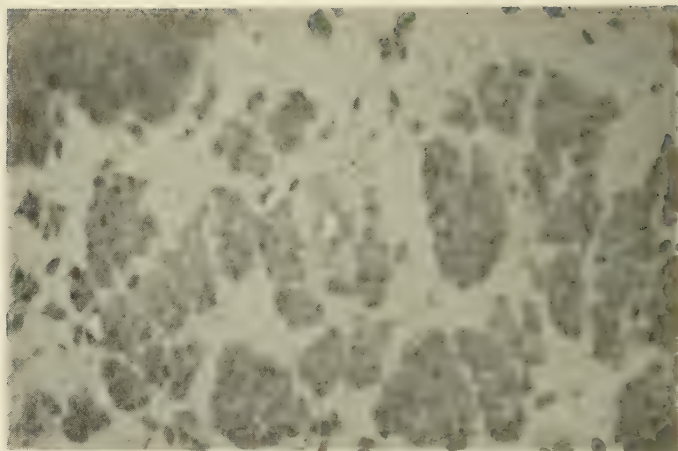


Abb. 13



Abb. 14



Abb. 15

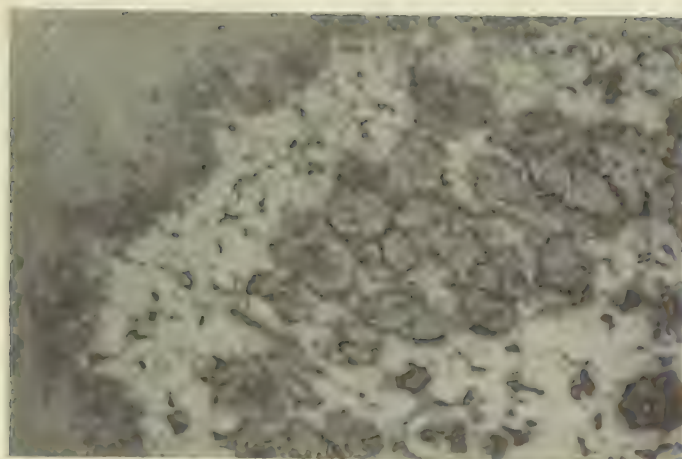


Abb. 16



Abb. 17

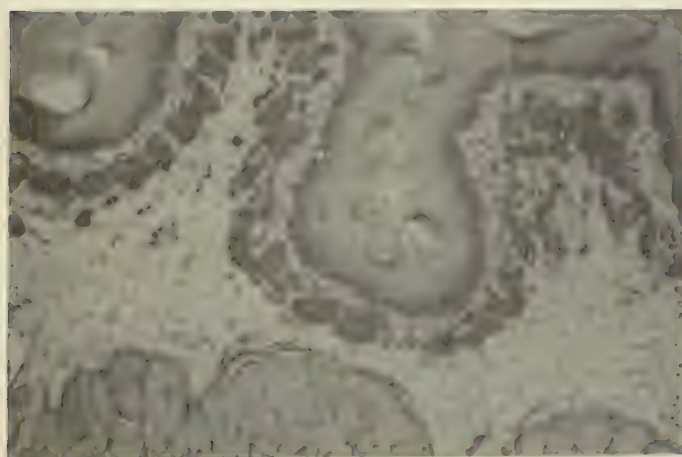


Abb. 18

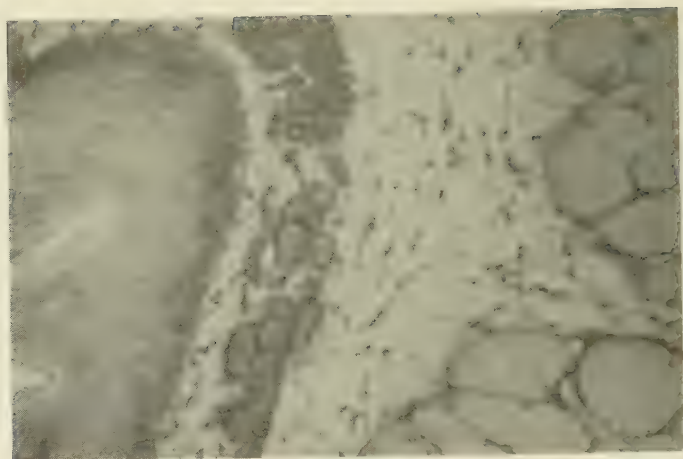


Abb. 19

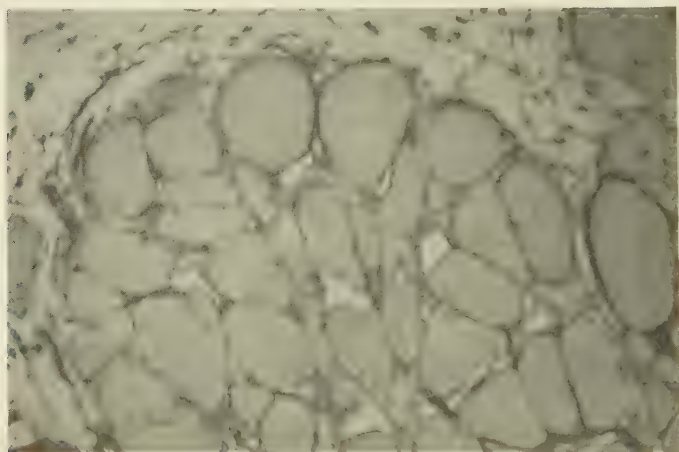


Abb. 20



Abb. 21

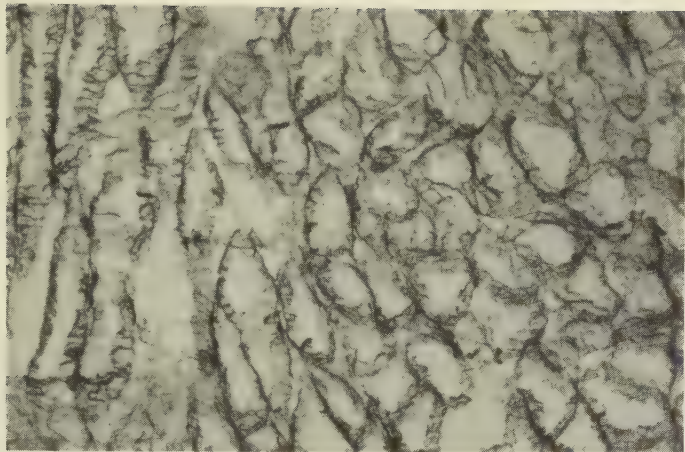


Abb. 22

Legende zu den Abbildungen 7 bis 22:

Abb.7: Schematischer Querschnitt des Ösophagus
aus: Sobotta/Hammersen (73)

Abb.8: indirekte Immunperoxidase-Methode auf Kaninchen-
ösophagus; Gegenfärbung mit Hämalaun:
IgA-nachweisende Präzipitate im Bereich der
Lamina muscularis mucosae
(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS;
HRP-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)
x 25

Abb.9: Negativkontrolle zu Abb.8, ohne Gegenfärbung
x 25

Abb.10: indirekte Immunperoxidase-Methode auf Kaninchen-
ösophagus ohne Gegenfärbung:
deutliche IgA-nachweisende Präzipitate im Bereich
des Endomysiums um die Muskelzellen in der Lamina
muscularis mucosae
(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS;
HRP-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)
x 100

Abb.11: x 400

Abb.12: Negativkontrolle zu Abb. 10 und 11
x 100

Abb.13: indirekte Immunperoxidase-Methode auf Kaninchen-
ösophagus; Gegenfärbung mit Hämalaun:
Nachweis von Antikörper gegen glatte Muskulatur
(ASMA) mit IgA-nachweisenden Reaktionsprodukten

im Bereich des Sarkoplasmas der glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae unter Ausparung des Endomysiums

(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS;
HRP-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)
x 400

Abb.14: indirekte Immunfluoreszenz auf Kaninchenösophagus:
IgA-EmA nachweisende netzförmige Fluoreszenz im Bereich der Lamina muscularis mucosae
(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS;
FITC-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)
x 400

Abb.15: Negativkontrolle zu Abb.14
x 400

Abb.16-20: indirekte Immunperoxidase-Methode auf Kaninchenösophagus, Gegenfärbung mit Hämalaun:
deutliche Darstellung von IgA-nachweisenden fibrillären und retikulären Reaktionsprodukten im Endomysium der Lamina muscularis mucosae sowie der Tunica muscularis (Abb.17-20)

(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS,
HRP-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)

Abb.16 x 400

Abb.17 x 100

Abb.18 x 100

Abb.19 x 400

Abb.20 x 400

Abb.21: indirekte Immunfluoreszenz auf Kaninchenösophagus:
Nachweis von IgA-EmA im Endomysium der Tunica muscularis

(Patientenserum: 1:5 verdünnt in PBS,
FITC-anti-Human-IgA, Kaninchen, 1:30)
x 400

Abb.22: Nachweis von Retikulinfasern in quergestreifter
Muskulatur (Tunica muscularis) von Kaninchen-
ösophagus durch Silberfärbung nach Bielschowsky
(argyrophile Gitterfasern im Bereich des Endo-
mysiums)
x 400

2. Vorkommen der IgA-EmA bei Dermatitis herpetiformis
Duhring (DH), Zöliakie und linearer IgA-Dermatose (LAD)

2.1 Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IIF)

Untersucht wurden mit Hilfe der IIF die Seren von neun Patienten mit DH, von sieben Patienten mit LAD und von zehn Patienten mit Zöliakie sowie 20 Kontrollseren.

Die IIF wurde mit Kaninchenösophagus - Kryostatschnitten und Affenösophagus - Kryostatschnitten als Antigensubstrate durchgeführt.

Bei Antikörper-positiven Seren wurde durch eine Serienverdünnung der Antikörper-Titer bestimmt.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz bei den einzelnen Patientengruppen zusammengestellt:

1. DH

Mit dem Antigensubstrat Affenösophagus konnten im Serum von sechs der neun Patienten mit DH IgA-EmA nachgewiesen werden (66 %), mit dem Antigensubstrat Kaninchenösophagus waren vier Patientenserum positiv (44 %).

Die Patientenserum mit niedrigem IgA-EmA-Titer (1:5) zeigten nur auf dem Antigensubstrat Affenösophagus ein positives Ergebnis.

2. Zöliakie

Im Serum von neun der zehn Patienten mit Zöliakie konnten IgA-EmA nachgewiesen werden (90 %).

Dabei gab es keinen Unterschied zwischen Kaninchen- und

Affenösophagus als Antigensubstrate.

Der niedrigste IgA-EMA-Titer betrug 1:40.

3. LAD

In keinem Serum von sieben Patienten mit LAD konnten IgA-EMA nachgewiesen werden (0 %).

4. Kontrollgruppe

Sämtliche Seren der Kontrollgruppe, die aus sieben gesunden Personen, vier Patienten mit Pemphigus vulgaris, sechs Patienten mit bullösem Pemphigoid und einem Patienten mit Urticaria bestand, waren IgA-EMA-negativ.

Tabelle 2: Nachweis der IgA-EmA mit Hilfe der IIF

Patienten	Alter	Affenösophagus			Kaninchenösophagus		
		IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
<u>DH</u>							
O.W.	44	1:80	-	-	1:80	-	-
B.J.	29	1:160	-	-	1:160	-	-
P.C.	35	1:80	-	-	1:80	-	-
S.A.	6	1:160	-	+	1:160	-	-
S.B.	39	1:5	-	-	-	-	-
S.H.	58	1:5	-	-	-	-	-
H.H.	71	-	-	-	-	-	-
H.I.	23	-	-	-	-	-	-
Z.L.	63	-	-	-	-	-	-

<u>CD</u>							
E.F.	7	1:80	-	-	1:80	-	-
G.M.	3	1:80	-	-	1:80	-	-
M.A.	8	1:320	-	-	1:320	-	-
P.O.	4	1:40	-	-	1:40	-	-
S.S.	4	1:160	-	-	1:160	-	-
A.F.	8	1:160	-	-	1:160	-	-
L.B.	23	-	-	-	-	-	-
V.J.	4	1:160	-	-	1:160	-	-
G.D.	2	1:80	-	-	1:80	-	-
K.F.	2	1:160	-	-	1:160	-	-

<u>LAD</u>							
W.A.	18	-	-	-	-	-	-
P.A.	24	-	-	-	-	-	-
B.R.	23	-	-	-	-	-	-
E.J.	29	-	-	-	-	-	-
W.P.	27	-	-	-	-	-	-
S.K.	76	-	-	-	-	-	-
S.E.	57	-	-	-	-	-	-

DH = Dermatitis herpetiformis Duhring

CD = Zöliakie

LAD= lineäre IgA - Dermatoze

2.2. Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode

Neben der IIF wurden sämtliche Seren mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode getestet.

Wiederum wurde jede Serumprobe sowohl auf Affenösoophagus als auch Kaninchenösoophagus als Antigensubstrat untersucht.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der indirekten Immunperoxidase-Methode bei den einzelnen Patientengruppen zusammengefaßt.

Die Ergebnisse der indirekten Immunperoxidase-Methode entsprechen denen der IIF:

1. DH

Mit dem Antigensubstrat Affenösoophagus konnten im Serum von sechs der neun Patienten mit DH IgA-EMA nachgewiesen werden (66 %), mit dem Antigensubstrat Kaninchenösoophagus waren vier Patientenserum positiv (44%).

Die Patientenserum mit niedrigem IgA-EMA-Titer (1:5) zeigten nur auf dem Antigensubstrat Affenösoophagus ein positives Ergebnis.

2. Zöliakie

Im Serum von neun der zehn Patienten mit Zöliakie konnten IgA-EMA nachgewiesen werden (90 %).

Dabei gab es keinen Unterschied zwischen Kaninchen- und Affenösoophagus als Antigensubstrate.

3. LAD und Kontrollgruppe

In keinem Serum der LAD-Patienten und der Kontrollgruppe konnten IgA-EMA nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Nachweis der IgA-EmA mit Hilfe der
indirekten Immunperoxidase Methode

		Affenösophagus		Kaninchenösophagus	
Patienten	Alter	IgA	IgG	IgA	IgG
<u>DH</u>					
O.W.	44	1:80	-	1:80	-
B.J.	29	1:160	-	1:160	-
P.C.	35	1:80	-	1:80	-
S.A.	6	1:160	-	1:160	-
S.B.	39	1:5	-	-	-
S.H.	58	1:5	-	-	-
H.H.	71	-	-	-	-
H.I.	23	-	-	-	-
Z.L.	63	-	-	-	-

CD

E.F.	7	1:80	-	1:80	-
G.M.	3	1:80	-	1:80	-
M.A.	8	1:320	-	1:320	-
P.O.	4	1:40	-	1:40	-
S.S.	4	1:160	-	1:160	-
A.F.	8	1:160	-	1:160	-
L.B.	23	-	-	-	-
V.J.	4	1:160	-	1:160	-
G.D.	2	1:80	-	1:80	-
K.F.	2	1:160	-	1:160	-

LAD

W.A.	18	-	-	-	-
P.A.	24	-	-	-	-
B.R.	23	-	-	-	-
E.J.	29	-	-	-	-
W.P.	27	-	-	-	-
S.K.	76	-	-	-	-
S.E.	57	-	-	-	-

DH = Dermatitis herpetiformis Duhring

CD = Zöliakie

LAD = lineäre IgA-Dermatose

2.3. Nachweis der IgA-EmA nach gelchromatographischer Auftrennung der Serumimmunglobuline

Die gelchromatographische Auftrennung der Serumimmunglobuline wurde wie auf Seite 24 beschrieben durchgeführt.

In den Eluaten wurde die IgG- und IgA-Konzentration nephelometrisch bestimmt, gleichzeitig wurden alle Eluate in der IIF auf Affenösophagus nach Endomysium-Antikörper der IgG- und IgA-Klasse untersucht.

Endomysium-Antikörper konnten, wie Tabelle 4 und Abbildung 23 zeigen, in der IgA-haltigen Serumfraktion, nicht hingegen in den IgG- und IgM-haltigen Fraktionen nachgewiesen werden.

Die stärkste Antikörper-Aktivität zeigte sich in der Fraktion mit der höchsten IgA-Konzentration (Eluat Nr.40, IgA-Konz.: 24,86 mg/dl).

Dagegen konnte selbst in der Fraktion mit der höchsten IgG-Konzentration von 89,72 mg/dl keine Antikörper-Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 4: IgA- und IgG-Konzentrationen in den einzelnen Eluaten und Nachweis von Endomysium-Antikörper im IIF - Test auf Affenösophagus

Eluat	IgA	IgG	IgA-EmA	IgG-EmA
32	1,43 1)		- 2)	-
33			-	-
34	2,90		-	-
35			-	-
36	3,70		-	-
37			(+)	-
38	13,90	1,16	+	-
39	22,37	1,48	++	-
40	24,86	1,90	++	-
41	19,02	5,78	+	-
42	14,84	19,43	(+)	-
43	8,07	45,77	-	-
44		76,91	-	-
45		89,72	-	-
46	1,60	85,72	-	-
47		78,46	-	-
48			-	-
49		47,03	-	-
50			-	-
51		27,97	-	-

1) Serumkonzentration in mg/dl

2) - = negativ

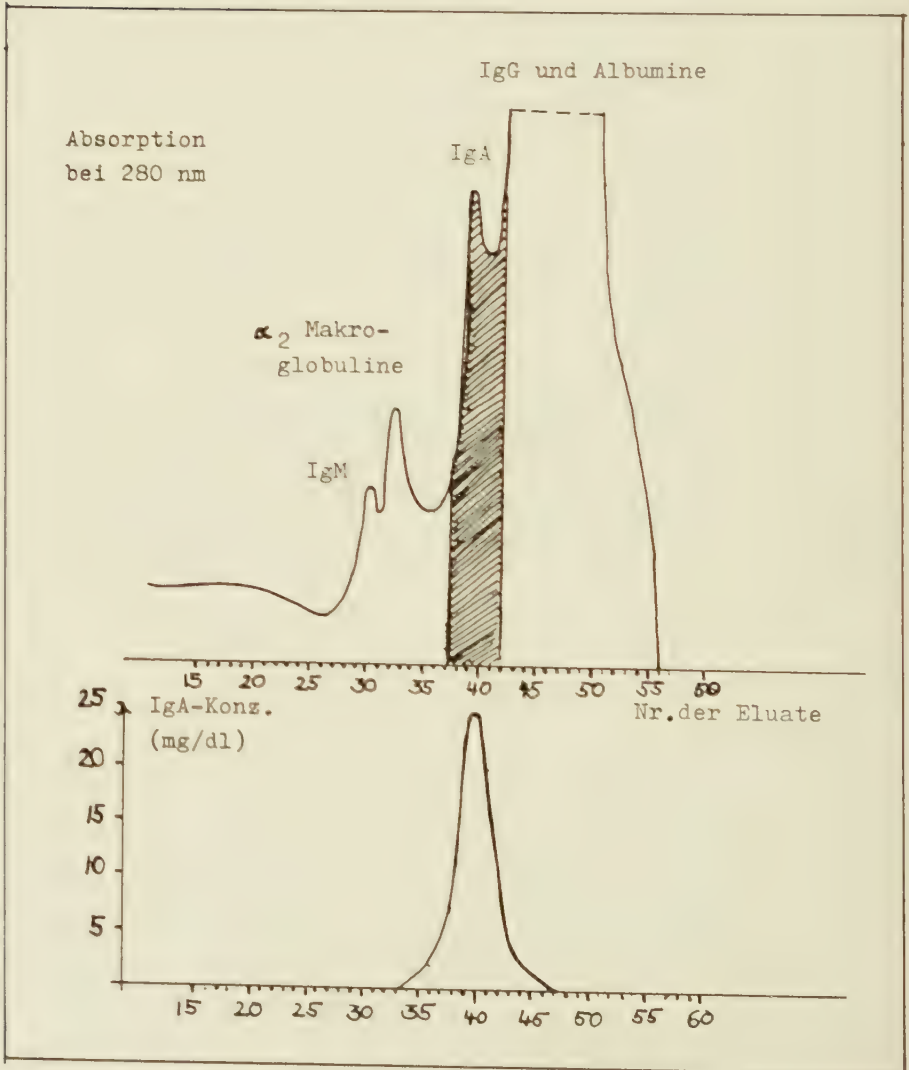
+ = positiv

(+) = schwach positiv

++ = stark positiv

Abb. 23: Elutionsprofil eines IgA-EmA-positiven Serums

- der schraffierte Bereich kennzeichnet die Antikörper-positiven Eluate
- im unteren Teil der Abbildung ist die jeweilige IgA-Konz. in den einzelnen Eluaten graphisch aufgetragen



3. IgA-EmA bei glutensensitiver Enteropathie

In unserem Patientengut weisen sieben der neun Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring eine Enteropathie auf, die jeweils bioptisch gesichert wurde (77,7 %).

Tabelle 5 zeigt, daß bei sechs von diesen sieben Patienten mit glutensensitiver Enteropathie IgA-EmA (85,7%) mit einem Titer von 1:5 bis 1:160 nachgewiesen werden konnten.

Gleichzeitig hatten neun von zehn Patienten mit Zöliakie, bei denen meist eine totale Zottenatrophie besteht, IgA-EmA (90 %) mit einem Titer von 1:40 bis 1:320.

Dagegen wies keiner der beiden Patienten mit DH ohne Enteropathie und keiner der sieben Patienten mit LAD, bei denen ebenfalls keine Dünndarmbeteiligung bestand, IgA-EmA auf.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei keinem Patienten mit normalen Mukosaverhältnissen IgA-EmA vorhanden sind, während von den insgesamt 17 Patienten mit bioptisch gesicherter Enteropathie 15 IgA-EmA aufweisen (88,2 %).

3.1. Gemeinsames Vorkommen von IgA-EMA und Gliadin-Antikörper bei DH, LAD und Zöliakie

Von Frau Dr. Bürgin-Wolff vom Kinderspital der Universität Basel wurden die Seren der Patienten mit DH, LAD und Zöliakie nach der 1976, 1979 und 1983 publizierten Methode (9,10,72) auf Gliadin-Antikörper untersucht.

Tabelle 5 zeigt, daß alle zehn Patienten mit Zöliakie Gliadin-Antikörper (100 %) mit hohen Titern (1:40 - 1:640) haben.

In allen Fällen gehören die Gliadin-Antikörper der IgG-Klasse an, in sieben Fällen auch der IgA-Klasse.

Dagegen haben nur drei der neun Patienten mit DH Gliadin-Antikörper (33,3 %).

Die Antikörper gehören der IgG-Klasse an und die Antikörper-Titer sind niedrig (1:10 - 1:20).

Weder in den sieben Fällen mit LAD noch in den 20 Kontrollseren konnten Gliadin-Antikörper nachgewiesen werden.

Tabelle 5: IgA-EmA, Gliadin-Antikörper und Enteropathie
bei DH und Zöliakie

			biop. gesicherte	Gliadin - Antikörper	
Pat.	Alter	IgA-EmA	Zottenatrophie	IgG	IgA
<u>DH</u>					
O.W.	44	1:80	+	-	-
B.J.	29	1:160	+	1:20	-
P.C.	35	1:80	+	1:10	-
S.A.	6	1:160	+	1:20	-
S.B.	39	1:5	+	-	-
S.H.	58	1:5	+	-	-
H.H.	71	-	-	-	-
H.I.	23	-	-	-	-
Z.L.	63	-	+	-	-

CD

E.F.	7	1:80	+	1:40	1:80
G.M.	3	1:80	+	1:80	1:40
M.A.	8	1:320	+	1:160	1:80
P.O.	4	1:40	+	1:80	1:40
S.S.	4	1:160	+	1:40	1:80
A.F.	8	1:160	+	1:320	-
L.B.	23	-	+	1:640	1:40
V.J.	4	1:160	+	1:640	-
G.D.	2	1:80	+	1:640	-
K.F.	2	1:160	+	1:640	1:640

DH = Dermatitis herpetiformis Dühring

CD = Zöliakie

3.2. IgA-EmA unter glutenfreier Diät bzw. unter Therapie mit DADPS

Bei vier Patienten mit DH und Enteropathie konnten die IgA-EmA vor Therapie und über einen Zeitraum von einem Jahr unter Therapie kontrolliert werden. Alle Patienten hatten hohe Antikörper-Titer von 1:80 - 1:160.

Bei zwei Patienten wurde die Therapie ausschließlich mit glutenfreier Diät und bei zwei Patienten ausschließlich mit DADPS (50 - 150 mg/d) durchgeführt.

Die mit DADPS behandelten Patienten waren nach 4-6 Wochen, die unter glutenfreier Diät stehenden Patienten nach 4-12 Monaten erscheinungsfrei.

Abbildung 24 zeigt, daß bei den mit DADPS behandelten Patienten unabhängig vom klinischen Verlauf die Titer der IgA-EmA über ein Jahr persistierten.

Bei einem Patienten mit glutenfreier Diät sank der IgA-EmA-Titer bereits nach vier Monaten unter die Nachweisgrenze, bei dem zweiten Patienten erst nach 12 Monaten; gleichfalls kam es zu einem Abfall der Gliadin-Antikörper (s.Tab.6).

3.3. IgA-EmA nach Glutenbelastung

Das Serum eines zwei-jährigen Patienten konnte vor und nach Belastung mit Gluten (die von Frau Dr. Bürgin-Wolff durchgeführt wurde) auf IgA-EmA untersucht werden.

Tabelle 7 zeigt, daß der Patient, bei dem nach einjähriger glutenfreier Diät keine Antikörper mehr nachweisbar waren, nach Glutenbelastung IgA-EmA mit einem Titer von 1:160 aufwies.

Gleichfalls kam es zu einem Anstieg des Gliadin-Antikörper-Titers von 1:10 auf 1:40.

Abb.24: Titerverlauf der IgA-EmA unter Therapie mit glutenfreier Diät (GFD) bzw. unter Therapie mit DADPS

Patienten: I : GFD 2 Wochen nach Krankheitsbeginn
II : GFD 4 Wochen nach Krankheitsbeginn
III: keine GFD, Therapie mit DADPS
IV : keine GFD, Therapie mit DADPS

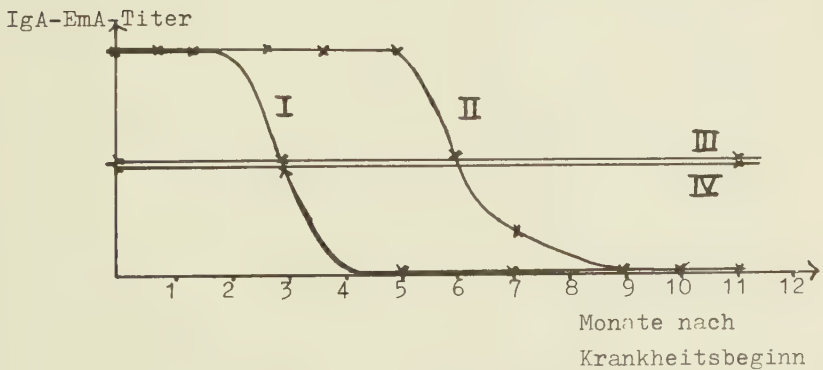


Tabelle 6: IgA-EmA und Gliadin-Antikörper unter gliadin-freier Diät (GFD) bei DH (Pat.I, Abb. 24)

Datum	IgA-EmA-Titer	Gliadin-Antikörper-Titer
keine GFD:		
7/83	1:160	1:20
10/83	1:160	1:20
GFD:		
11/83	1:80	1:10
3/84	-	-
10/84	-	-
12/84	-	-

Tabelle 7: IgA-EmA nach Glutenbelastung bei Zöliakie

Datum	IgA-EmA-Titer	Gliadin-Antikörper-Titer
GFD:		
8/83	-	1:10
Gluten-Belastung:		
10/83	1:160	1:40

3.4. Nachweis von IgA-EmA nach Absorption mit Gliadin

Um genauere Vorstellungen über die Beziehung zwischen IgA-EmA und Gliadin-Antikörper zu erhalten, wurden die Gliadin-Antikörper durch Inkubation mit 1%iger Gliadin-Lösung absorbiert.

Dazu verwendeten wir drei Seren mit hohem IgA-EmA-Titer, sowie hohem Gliadin-Antikörper-Titer.

Nach Inkubation der drei Seren wurde das Präzipitat durch Zentrifugieren entfernt.

Diese Absorption wurde von Frau Dr. Bürgin-Wolff in Basel durchgeführt, die auch gleichzeitig die Gliadin-Antikörper-Titer vor und nach Absorption bestimmte.

Die gleichen Serumproben wurden von uns mit der indirekten Immunperoxidase-Methode nach IgA-EmA untersucht.

Wie in Tabelle 8 dargestellt, waren in allen Fällen nach Absorption IgG- und IgA-Gliadin-Antikörper nicht mehr nachweisbar.

Dagegen zeigten die Seren nach Absorption unverändert hohe Titer von IgA-EmA.

Tabelle 8: Antikörper-Titer vor und nach Absorption

	Gliadin-Antikörper		
	IgG	IgA	IgA-EmA
V. Juan-Carlos	1:640	-	1:160
nach Absorption	-	-	1:160
G. Diego	1:640	-	1:80
nach Absorption	-	-	1:80
K. Florian	1:640	1:640	1:160
nach Absorption	-	-	1:160

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methode

IgA-Endomysium-Antikörper wurden erstmals 1983 von Chorzel-ski bei 68,4 % der Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachge-wiesen (12,14).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zum Nachweis der IgA-EMA neben der IIF auch die indirekte Immunperoxi-dase-Methode verwendet werden kann; beide Methoden besitzen die gleiche Sensitivität.

Für die routinemäßige Anwendung könnte die indirekte Immun-peroxidase-Methode gegenüber der IIF einige Vorteile bieten:

- Immunperoxidase-Präparate sind im Gegensatz zu fluores-zenzmarkierten Präparaten stabil und die Ergebnisse licht-mikroskopisch auswertbar,
- das Reaktionsprodukt der Enzymfärbung kann mit einer Gegenfärbung kombiniert werden, was die Zuordnung der Antikörper-Niederschläge zu zellulären Strukturen er-leichtert.

Aufgrund dieser Vorteile scheint die indirekte Immunperoxi-dase-Methode zum Nachweis der IgA-EMA geeigneter zu sein als die IIF, zumal die technische Durchführung der indirek-ten Immunperoxidase-Methode problemlos ist.

Als Antigensubstrate dienten bei beiden Methoden Affen- und Kaninchenösophagus; Affenösophagus reagiert dabei em-pfindlicher mit diesen Antikörpern als Kaninchenösophagus, so daß auf Affenösophagus bereits IgA-EMA-Titer von 1:5 nachgewiesen werden konnten.

Bindungsstelle für IgA-EmA ist das Endomysium der glatten und quergestreiften Muskulatur, d.h. die bindegewebige Hülle, die die Muskelfaserbündel von glatter und quergestreifter Muskulatur umgibt.

Besonders gut mit den Antikörpern reagiert das Endomysium der lumenwärts gelegenen Lamina muscularis mucosae, die aus glatter Muskulatur besteht.

Dagegen reagiert das Endomysium der Tunica muscularis, die im oberen Teil des Ösophagus aus quergestreifter Muskulatur besteht und dann nach unten in glatte Muskulatur übergeht, mit den IgA-EmA nur, wenn diese mit einem hohen Titer im Serum vorhanden sind.

Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Kumar, Beutner und Chorzeliski (45), die eine unterschiedliche Verteilung der speziellen Antigene im Ösophagus vermuten.

Die eigentliche Antigen determinante innerhalb des Endomysiums ist nicht bekannt.

Das Endomysium besteht hauptsächlich aus Retikulinfasern, die durch die Versilberungsmethode dargestellt werden können (s. Abb. 22).

Das Muster der argyrophilen Fasern entspricht genau den Antikörper - Bindungsstellen, die sich in der IIF bzw. der indirekten Immunperoxidase-Methode darstellen (s. Abb. 20 und 21).

Retikulin wird zum Kollagentyp III gerechnet, der hauptsächlich im Interstitium der parenchymatösen Organe, der Lamina propria der Schleimhäute und der subepidermalen Schicht der Haut zu finden ist (3).

Noch nicht geklärt ist, ob die Endomysium-Antikörper mit den bereits früher entdeckten Retikulin-Antikörper identisch sind (2,18,27,51,53,46,68).

Wir führten die IIF mit den IgA-EMA-positiven Seren auch auf den Antigensubstraten Rattenleber und Rattenniere durch, konnten auf diesen Gewebesubstraten allerdings keine Antikörper-Bindung an Retikulin beobachten (Ergebnisse nicht dargestellt).

2. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß 85,7 % der Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring und Enteropathie sowie 90 % der Patienten Zöliakie IgA-Endomysium-Antikörper aufweisen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß kein DH-Patient ohne Enteropathie und kein Patient mit LAD diese Antikörper aufweist.

Die diagnostische Bedeutung der IgA-EMA besteht darin, daß sie ein spezifische serologischer Indikator für Darmbeteiligung bei DH sind. Durch den Nachweis dieser Antikörper kann in besonderen Fällen auf eine Darmbiopsie verzichtet werden.

Weiterhin können die IgA-EMA als zusätzliches diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung zwischen DH und LAD herangezogen werden.

Unter glutenfreier Diät kommt es zu einem signifikanten Absinken der IgA-EMA-Titer, andererseits unter Glutenbelastung zum Anstieg der IgA-EMA-Titer.

Bei Patienten mit DH und glutensensitiver Enteropathie sind die Antikörper auch wichtig in der Verlaufskontrolle einer glutenfreien Diät und können Hinweise auf den Erfolg bzw. die konsequente Durchführung der Diät geben.

Um die Spezifität und Sensitivität der IgA-EmA in einem größeren Rahmen zu testen und die eigenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden die von uns getesteten Seren in eine internationale kollaborative Studie aufgenommen, die von Prof. Beutner in Buffalo, N.Y. und Prof. Chorzelski in Warschau organisiert wurde (5).

In dieser Studie wurden in vier Zentren die Seren von 57 Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring ohne glutenfreie Diät sowie 100 Kontrollseren untersucht.

Die Kontrollen beinhalten die Seren von 32 Patienten mit LAD, sowie Patienten mit anderen bullösen Erkrankungen und Dermatosen (s.Tab.9).

IgA-EmA fanden sich in keinem von 100 Kontrollen und bei 34 DH-Patienten (58 %). In dieser Studie wurde nicht zwischen DH mit und DH ohne Darmbeteiligung unterschieden. Auch in dieser Untersuchung war keiner der Patienten mit LAD IgA-EmA-positiv.

Unsere Ergebnisse und die in Tabelle 9 zusammengefaßten Ergebnisse belegen deutlich, daß IgA-EmA hochspezifisch für DH oder Zöliakie sind.

Tabelle 9: Internationale Studie zur Bestimmung der
Sensitivität und Spezifität der IgA-EmA
bei DH

Studiengruppe	DH-Patienten	IgA-EmA	Kontrollen	IgA-EmA
Leonard (London)	11	8 (73%)	6	0
Katz (NIH)	33	17 (52%)	22	0
Bean (Houston)	4	3 (75%)	45	0
Meurer (München)	9	6 (67%)	27	0

3. Diskussion der immunpathologischen Bedeutung von IgA- EMA

Bei Dermatitis herpetiformis Duhring sind außer Endomysium-Antikörper auch Retikulin-Antikörper in 17-68 % (2,18,27,46,51,53,68,69) und Gliadin-Antikörper in 60 - 70 % (44,57) der Fälle beschrieben worden.

Wir haben Gliadin-Antikörper bei 33,3 % der Patienten mit DH nachweisen können. Gliadin-Antikörper-positiv waren nur DH-Patienten mit assoziierter glutensensitiver Enteropathie.

IgA-Endomysium-Antikörper und Gliadin-Antikörper sind wahrscheinlich nicht identisch, weil, wie wir zeigen konnten, die Absorption der Seren mit Gliadin-Lösung nicht zum Absinken der Endomysium-Antikörper führt.

Beide Antikörper sind aber vermutlich Indikatoren für Darmbeteiligung bei M. Duhring.

Es ist anzunehmen, daß bei sensibilisierten Patienten durch Zufuhr von Gluten die Antikörper-Bildung in den Peyerschen Plaques induziert wird.

Über die Beteiligung dieser Antikörper an der Auslösung bullöser Hautveränderungen bei DH liegen keine schlüssigen Erkenntnisse vor.

Von der Meer (78,79) vermutet, daß zirkulierende Immunkomplexe aus Gliadin und Gliadin-Antikörpern sich in den Papillenspitzen der Haut ablagern können und möglicherweise über die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade entzündliche Veränderungen auslösen.

Seah und Fry (70) haben die Theorie vorgeschlagen, daß zirkulierende IgA-Antikörper, die gegen Gliadin gerichtet sind,

mit verwandten Antigen-Strukturen in den Papillenspitzen kreuzreagieren und dort die Hauterscheinungen verursachen.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß die IgA-EmA und Gliadin-Antikörper nicht identisch sind.

Es ist denkbar, daß die zytotoxische Wirkung von Gluten bzw. von gluten-sensibilisierten Lymphozyten auf die Darmschleimhaut bei diesen Patienten zur Freilegung von antigenen Faserstrukturen führt, gegen die Antikörper der IgA-Klasse gebildet werden.

Diese, im geschädigten Darm gebildeten Antikörper, treten in den Blutkreislauf über und können sich möglicherweise an Faserstrukturen der Papillenspitzen niederschlagen und hier zu den krankheitstypischen Erscheinungen der Dermatitis herpetiformis Duhring führen.

Durch die glutenfreie Diät wird vermutlich die Darmschädigung und damit die weitere Bildung der Antikörper verhindert. Die rein symptomatische Therapie mit DADPS scheint dagegen nur die entzündlichen Auswirkungen dieser Antikörper-Bindung in der Haut, nicht dagegen die Antikörper-Produktion selbst zu beeinflussen.

Noch ungeklärt ist, warum Kinder mit Zöliakie, die fast alle diese IgA-EmA in hohen Titern aufweisen, weder Hauterscheinungen noch immunhistologische Niederschläge in der Haut zeigen.

Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die zirkulierenden IgA-EmA nicht mit den IgA-Antikörpern identisch sind, die bei DH in der Haut nachweisbar sind, sondern lediglich einen empfindlichen Indikator für Darmschädigung bei Dermatitis herpetiformis Duhring und Zöliakie darstellen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis der IgA-Endomysium-Antikörper ist sowohl mit der von Chorzelski et al 1983 verwendeten indirekten Immunfluoreszenz (12,14) als auch mit der von uns erstmals eingesetzten indirekten Immunperoxidase-Methode möglich.

Beide Methoden besitzen die gleiche Sensitivität.

Als Antigensubstrate dienten Affen- und Kaninchenösophagus, wobei Affenösophagus etwas empfindlicher mit den Antikörpern reagiert.

Die IgA-Antikörper binden in den Antigensubstraten an das Endomysium der glatten und quergestreiften Muskulatur. Die Antigendeterminanten sind nicht bekannt; möglicherweise handelt es sich um argyrophile Fasern bzw. um Retikulinfasern vom Kollagentyp III.

Zum Nachweis der Antikörper standen 26 Seren von Patienten mit DH, LAD und Zöliakie, sowie 20 Kontrollseren zur Verfügung.

Zirkulierende IgA-Endomysium-Antikörper konnten bei 66 % der Patienten mit DH und bei 90 % der Patienten mit Zöliakie nachgewiesen werden, dagegen bei keinem Patienten mit LAD und bei keinem Patienten der Kontrollgruppe.

Die Antikörper-Titer lagen bei den Patienten mit DH zwischen 1:5 und 1:160 und bei den Patienten mit Zöliakie zwischen 1:40 und 1:320.

Durch die gelchromatographische Auftrennung der Serumimmunoglobuline konnte gezeigt werden, daß die Endomysium-Antikörper ausschließlich der IgA-Klasse angehören.

Von den insgesamt 17 Patienten mit DH und bioptisch gesicherter Enteropathie oder mit Zöliakie hatten 15 IgA-EMA während kein Patient mit DH und LAD ohne Enteropathie IgA-EMA aufwies.

Bei 33,3 % der DH-Patienten mit Darmbeteiligung konnten zusammen mit den IgA-EMA gleichzeitig Gliadin-Antikörper der IgG-Klasse mit einem Titer zwischen 1:10 und 1:20 nachgewiesen werden.

Die Absorption der Patientenserum mit Gliadin hatte keinen Einfluß auf die IgA-EMA, während Gliadin-Antikörper nach Absorption nicht mehr nachweisbar waren.

Die Verlaufskontrolle bei vier Antikörper-positiven Patienten über ein Jahr ergab, daß die IgA-EMA unter Therapie mit glutenfreier Diät innerhalb 4-12 Monate absinken, während eine mit DADPS durchgeführte Therapie ohne Einfluß auf die IgA-EMA-Titer blieb.

Diese Ergebnisse zeigen, daß IgA-EMA ein spezifischer serologischer Indikator für Darmbeteiligung bei Dermatitis herpetiformis Duhring darstellen.

In besonderen Fällen kann durch den Nachweis von IgA-EMA auf eine Dünndarmbiopsie verzichtet werden.

Gleichzeitig sind die IgA-EMA ein guter Verlaufsparemeter bei den Patienten, die ausschließlich mit glutenfreier Diät behandelt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß IgA-EmA nur bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring und Zöliakie vorkommen, nicht hingegen bei Patienten mit einer Sonderform der DH, der lineären IgA-Dermatose.

Diese Antikörper können daher als zusätzliches diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung der klassischen Dermatitis herpetiformis Duhring von der lineären IgA-Dermatose dienen und sind möglicherweise ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Pathomechanismus der beiden Krankheitsbilder.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexander JO (1975)
Dermatitis herpetiformis. In Rock A (ed):
Major problems in dermatology, vol.4.
Saunders, London-- Philadelphia
2. Alp MH, Wright R (1971)
Autoantibodies to reticulin in patients with
idiopathic steatorrhoe, colliac disease, and
Crohn's disease, and their relation to immunglobulins
and dietary antibodies
Lancet 2:682-685
3. Benninghoff A (1984)
Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Men-
schen, Band 1, 14.Auflage
Urban & Schwarzenberg München-Berlin-Wien
4. Berger E (1958)
Zur allergischen Pathogenese der Coeliakie, mit Ver-
suchen über die Spaltung pathogener Antigene durch
Fermente.
Ann Paediat (Basel) Suppl.61:1
5. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V (1985)
Evaluation of sensitivity and spezifity of IgA class
antiendomysial antibodies for dermatitis herpetiformis
J Invest Dermatol 84:332 (Abstr.)
6. Blackwell JN, Barnetson RStC, Gilmour HM, Ferguson A,
Heading RC (1980)
Does gluten cause the enteropathy and the skin lesion
in dermatitis herpetiformis?
Gut 21:A923 (Abstr.)

7. Bourne JA (1983)
Handbook of immunoperoxidase staining methods.
Dako Corporation, Santa Barbara, USA
8. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1984)
Dermatologie und Venerologie. 3. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio
9. Bärigin-Wolff A, Bertele RM, Berger R, Gaze H, Harms HK,
Just M, Khana S, Schürmann K, Signer E, Tomovic D (1983)
A reliable screening test for childhood coeliac disease:
fluorescent immunosorbent test for gliadin antibodies.
J Pediatr 102:655-660
10. Bärigin-Wolff A, Hernandez R, Just M, Signer E (1976)
Immunfluorescent antibodies against gliadin: a screening
test for coeliac disease.
Helv paediat Acta 31:375-380
11. Carswell F, Ferguson A (1973)
Food antibodies in serum - a screening test for coeliac
disease.
Arch Dis Childh 47:594-598
12. Chorzelski TP (1983)
In workshop on "Immunfluorescent and immunoelectron
microscopy techniques",
Proc. of the XVI th Intern Congr of Dermatol, Tokyo
Univ Tokyo Press, 1983, 593-597
13. Chorzelski TP, Beutner EH, Jablonska S, Blaszyk C,
Triftshauser C (1971)
Immunofluorescence studies in the diagnosis of
dermatitis herpetiformis and its differentiation from
bullous pemphigoid.
J Invest Dermatol 56:373-380

14. Chorzelski TP, Sulei J, Tchorzewska H (1983)
IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease
NY Acad Sci 1983:325-332
15. Cormane RH (1967)
Immunfluorescent studies of the skin of patients with dermatitis herpetiformis. An immunofluorescent study.
Br J Dermatol 81:493-501
16. Cornell HJ (1974)
Circulating antibodies to wheat gliadin fractions in coeliac disease.
Arch Dis Childh 49:454-457
17. Dick HM, Fraser NG, Murray D (1969)
Immunofluorescent antibody studies in dermatitis herpetiformis
Br J Dermatol 81:692-698
18. Eterman KP, Feltkamp TEW (1978)
Antibodies to gluten and reticulin in gastrointestinal diseases.
Clin exp Immunol 31:92-99
19. Fraser NG (1970)
Autoantibodies in dermatitis herpetiformis
Br J Dermatol 83:609-613
20. Fraser NG, Murray D, Alexander JO (1967)
Structure and function of the small intestine in dermatitis herpetiformis
Br J Dermatol 79:509-518

21. Frazer AC (1960)
Pathogenetic concepts of the malabsorption syndrom
Gastroenterology 38:389-398
22. Frödin T, Gotthard R, Hed J, Molin L, Norrby K,
Walan A (1981)
Gluten-free diet for dermatitis herpetiformis: the
long-term effect on cutaneous immunological and
jejunal manifestations.
Acta Derm Venerol (Stockh.) 61:405-411
23. Fry L, McMinin RMH, Cowan JD, Hoffbrand AV (1967)
Small intestinal structure and function and
haematological changes in dermatitis herpetiformis.
Lancet II:729-734
24. Fry L, McMinin RMH, Cowan JD, Hoffbrand AV (1969)
Gluten-free diet and reintroduction of gluten in
dermatitis herpetiformis
Arch Derm 100:129-135
25. Fry L, Seah PP (1974)
Dermatitis herpetiformis: an evaluation of diagnostic
criteria.
Br J Dermatol 90:137-146
26. Gabbiani G, Ryan CB, Lamelin JP, Vassali P, Majano G,
Bouvier CA, Cruchand A, Luscher EF (1973)
Human smooth muscle autoantibody. Its identification
as antiactin antibody and a study of its binding to
"nonmuscular" cells
Am J Path 3:473-486

27. Hällstrom O, Reunala T (1985)
IgA class reticulin antibodies in dermatitis herpetiformis: a good indicator of jejunal damage.
Acta Derm Venerol (Stockh.) 65:330-332
28. Harrington CJ, Read NW (1977)
Dermatitis herpetiformis: effect of a gluten-free diet on skin IgA and jejunal structure and function.
Br Med J 1:872-875
29. Heading RC, Paterson WD, McLelland DBL, Barnetson RStC, Murray MSM (1976)
Clinical response of dermatitis herpetiformis skin lesions to a gluten-free diet.
Br J Dermatol 94:509-514
30. Heiner DC, Lakey ME, Wilson JF, Gerrard JW, Shwachman H, Khaw KT (1962)
Precipitins to antigens of wheat and cow's milk in coeliac disease.
J Pediatr 61:813-830
31. Holubar K, Doralt M, Eggerth G (1971)
Immunfluorescence patterns in dermatitis herpetiformis .
Investigation on skin and intestinal mucosa.
Br J Dermatol 85:505-510
32. Holzmann HP, Meurer M, Braun-Falco O (1986)
Aussagekraft des 19S-IgM-FTA-ABS-Tests für Diagnostik und Therapie der Syphilis.
Hautarzt (in Druck)
33. Jablonska S (1970)
Immunopathology of bullous disease
Ann Clin Res 2:7-12

34. Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Maciejowska E, Rzeska G (1976)
Dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid.
Intermediate and mixed forms.
Arch Dermatol 112:45-48

35. Kapuscinska A, Zalewski T, Chorzelski TP (1986)
Disease, specificity, sensitivity and dynamics of
changes in IgA class antiendomysial antibodies in
coeliac disease.
Gastroenterology (in press)

36. Katz SI (1980)
Dermatitis herpetiformis: the skin and the gut.
An Int Med 93:857-874

37. Katz SI, Strober W (1978)
The pathogenesis of dermatitis herpetiformis
J Invest Dermatol 70:63-75

38. Kenrich KG, Walker-Smith JA (1970)
Immunoglobulins and dietary protein antibodies in
childhood coeliac disease.
Gut 11:635-639

39. Kieffer M, Barnetson RStC, Blackwell Jn (1984)
Sequential studies of gliadin antibodies in patients
with dermatitis herpetiformis.
Arch Dermatol Res 276:74-77

40. Kresbach H, Hartwaegner A (1968)
Zur Differentialdiagnose zwischen Dermatitis herpetiformis
Duhring und bullösem Pemphigoid.
Z Haut-u Geschl-Kr 43:165-176

41. Kruizinga EE, Hamminga H (1958)
Treatment of dermatitis herpetiformis with diamino-
diphenylsulphone (DSS).
Dermatologica 106:368-394
42. Kuhnle J, Bertele-Harms R, Grösser A, Meurer M (1986)
Dermatitis herpetiformis and growth retardation.
Europ J Ped (in press)
43. Kuit A, Geerts ML, De Brauwere D (1976)
Diagnostic criteria in dermatitis herpetiformis.
Dermatologica 153:266-271
44. Kumar PJ, Ferguson A, Lancaster-Smith M, Clark ML (1976)
Food antibodies in patients with dermatitis herpeti-
formis and adult coeliac disease - relationship to
jejunal morphology.
Scand J Gastroenterol 11:5-10
45. Kumar V, Beutner EH, Chorzelski TP (1984)
Distribution of monkey esophagus antigens reaktive
with IgA-class antibodies in the sera of dermatitis
herpetiformis patients.
Arch Dermatol Res 276:293-296
46. Lancaster-Smith M, Kumar PJ, Clark ML, Marks R,
Johnson GD (1975)
Anti-reticulin antibodies in dermatitis Herpetiformis
and adult coeliac disease.
Br.J. Dermatol 92:37-42
47. Lawley TJ, Strober W, Yaoita H, Katz SI (1980)
Small intestinal biopsies and HLA types in dermatitis
herpetiformis patients with granula and linear IgA skin
deposits.
J Invest Dermatol 74:9-12

48. Leonard JN, Chorzelski TP, Beutner EH (1985)
IgA endomysial antibody detection in the serum of
patients with dermatitis herpetiformis following
gluten challenge.
Arch Dermatol Res 277:349-351
49. Leonard JN, Haffenden GP, Ring NP, McMinin RMH,
Sidgwick A, Mowbray JF, Unworth DJ, Holborow EJ,
Blenkinsopp WK, Swain AF, Fry L (1982)
Linear IgA disease in adults.
Br J Dermatol 107:301-316
50. Lever WF (1979)
Pemphigus and pemphigoid: a review of the advances
made since 1964.
J Am Acad Dermatol 1:2-31
51. Ljunghall K, Scheynius A, Forsum U (1979)
Circulating reticulin autoantibodies of IgA class in
dermatitis herpetiformis.
Br J Dermatol 100:173-176
52. Löffler G, Petrides PE, Weiss L, Harper HA (1979)
Physiologische Chemie, 2. Auflage
Springer, Berlin - Heidelberg - New York
53. Magalhaes AF, Peters TJ, Doe WF (1974)
Studies on the nature and significance of connective
tissue antibodies in adult coeliac disease and
Crohn's disease.
Gut 15:284-288
54. Marks J, Schuster S, Watson AJ (1966)
Small bowel changes in dermatitis herpetiformis.
Lancet II:1280-1282

55. Marks J, Schuster S, Watson AJ (1976)
Dermatitis herpetiformis. The role of gluten.
Arch Derm 101:452-463

56. McNeish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker-Smith JA (1979)
The diagnosis of coeliac disease: a commentary on the
current practices of members of the European Society
of Paediatric Gastroenterology and Nutrition
(ESPAGAN).
Arch DIS Child 54:783-789

57. Menzel EJ, Pehamberger H, Holubar K (1978)
Demonstration of antibodies to wheat gliadin in
dermatitis herpetiformis using ¹⁴C radioimmunoassays.
Clin Immunol 10:193-201

58. Meurer M, Schmoeckel Ch, Braun-Falco O (1984)
Dermatitis herpetiformis Duhring mit lineären Ab-
lagerungen von IgA (lineäre IgA-Dermatose).
Hautarzt 35:230-239

59. Mobacken H, Kastrup W, Ljunghall H, Löfberg H,
Nilson LA, Svensson A, Tjernlund K (1983)
Linear IgA dermatosis: a study of ten adult patients.
Acta Derm Venerol 63:123-128

60. Norberg R, Biberfeld H, Fagraeus A, Lidmann K,
Thorstensson R, Utter G (1977)
The reaction of cells with anti-actin sera in relation
to the amount of cellular actin.
Clin exp Immunol 28:512-516

61. O'Donoghue DP, Lancaster-Smith M, Johnson GD,
Kumar PJ (1976)
Gastric lesion in dermatitis herpetiformis.
Gut 17:185-188

62. Pehamberger H, Konrad K, Holubar K (1977)
Circulating IgA antibasement membrane in linear
dermatitis herpetiformis Duhring.
J Invest Dermatol 69:490-493

63. Reunala T (1978)
Gluten-free diet in dermatitis herpetiformis.
Br J Dermatol 98:69-78

64. Reunala T, Blomqvist K, Tarpila S, Halme H, Kangas K
(1977)
Gluten-free diet in dermatitis herpetiformis.
Clinical response of skin lesions in 81 patients.
Br.J. Dermatol 97:473-480

65. Scherer R (1976)
Routineanwendung von Immunfluoreszenzmethoden in
der Dermatologie.
Deutsches Ärzteblatt, Heft 40:2495-2500

66. Scherer R (1979)
Immunfluoreszenzuntersuchungen in der Dermatologie.
Med Klin 74:132-143

67. Seah PP, Fry L (1975)
Immunglobulin in the skin in dermatitis herpetiformis
and their relevance in diagnosis.
Br J Dermatol 92:157-166

68. Seah PP, Fry L, Hoffbrand AV, Holborow EJ (1971)
Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult
coeliac disease.
Lancet 1:834-836
69. Seah PP, Fry L, Holborow EJ, Rossiter MA, Doe WF,
Magalhaes AF, Hoffbrand AV (1973)
Anti-reticulin antibody: incidence and diagnostic
significance.
Gut 14:311-315
70. Seah PP, Fry L, Stewart JS, Chapman BL, Hoffbrand AV,
Holborow EJ (1972)
Immunglobulins in the skin in dermatitis herpetiformis
and coeliac disease.
Lancet 1:611-614
71. Shuster S, Watson AJ, Marks J (1968)
Coeliac syndrom in dermatitis herpetiformis.
Lancet 2:1101-1106
72. Signer E, Bürgin-Wolff A, Berger R, Birbaumer A,
Just M (1979)
Antibodies to gliadin as a screening test for coeliac
disease. A prospective studie.
Helv Paediatr Acta 34:41-52
73. Sobotta/Hammersen (1975)
Atlas der Histologie des Menschen
Urban und Schwarzenberg München - Berlin - Wien
74. Stendahl O, Molin L, Dahlgren C (1978)
The inhibition of polymorphonuclear leukocyte
cytotoxicity by dapsone; a possible mechanism in
the treatment of dermatitis herpetiformis.
J Clin Invest 62:214-220

75. Stern M, Fischer K, Grüttner R (1978)
Immunofluorescent gliadin antibodies in childhood
coeliac disease.
In: Perspectives in coeliac disease (ed. by B. Mc Nieholl,
C.F. Mc Carthy and P.F. Fottrell), p. 207-216.
MTP, Lancaster
76. Strober W, Falchuk M, Rogentine N, Nelson D,
Klaeveman L (1975)
The pathogenesis of gluten-sensitive enteropathy.
An Int Med 83:242-256
77. Unsworth DJ, Leonard JN, McMin RMH, Swain AF,
Holborow EJ, Fry L (1981)
Anti-gliadin antibodies and small intestinal mucosal
damage in dermatitis herpetiformis.
Br J Dermatol 105:653-658
78. Von der Meer JB (1969)
Granular deposits of immunoglobulins in the skin of
patients with dermatitis herpetiformis.
An immunofluorescent study.
Br J Dermatol 81:493-502
79. Von der Meer JB (1983)
Dermatitis herpetiformis. In: Immunopathology of the
skin. Labeled antibody studies. (Beutner et al eds)
Hutchinson & Ross, Stroudsburg
80. Von Tongren JHM, Van der Staak WJBM, Schilling PHM
(1967)
Small bowel changes in dermatitis herpetiformis.
Lancet 1:218-225

81. Yaoita H, Hertz KC, Katz SI (1976)
Dermatitis herpetiformis: Immunolectronmicroscopic
and ultrastructural studies of a patient with linear
deposits of IgA.
J Invest Dermatol 67:691-695

82. Yaoita H, Katz SI (1976)
Immunolectronmicroscopic localization of IgA in skin
of patients with dermatitis herpetiformis.
J Invest Dermatol 67:502-506

VIII. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Herrn OA Dr. M. Meurer gilt mein besonderer Dank für die Vorbereitung und Förderung sowie die freundliche Betreuung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Verbunden bin ich Frau Dr. A. Bürgin-Wolff vom Kinderspital der Universität Basel für die Überlassung einiger Seren, für die Durchführung der Gliadin-Antikörperbestimmung und Absorptionsversuche, sowie die freundliche Beratung und wertvollen Auskünfte.

Für die liebenswürdige Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanke ich mich ganz besonders bei Frau A. Heilmann, weiterhin bei Frau E. Ebmeyer für viele hilfreiche praktische Ratschläge, bei Frau D. Nau für die Durchführung der gelchromatographischen Auftrennung der Serumimmunglobuline und bei Frau G. Simon für die Anfertigung eines Präparates mit der Silberfärbung nach Bielschowsky.

IX. LEBENSLAUF

Personalien:

Name:	Reff
Vorname:	Peter
Geburtsdatum:	20.03.1960
Geburtsort:	Straubing
Eltern:	Ludwig Reff, Studienrat Gertrud Reff, geb. Urlberger
Familienstand:	ledig
Anschrift:	8440 Straubing Kattowitzer Str. 14

Schulbildung:

1966 - 1970	Ulrich-Schmidl-Volksschule, Straubing
1970 - 1979	Johannes-Turmair-Gymnasium, Straubing
27.06.1979	Abitur

Berufliche Ausbildung:

1979 - 1981	Studium Human-Medizin, Universität Regensburg
1981 - 1986	Studium Human-Medizin, LMU München
23.04.1986	Beendigung des Studiums mit dem Ablegen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

